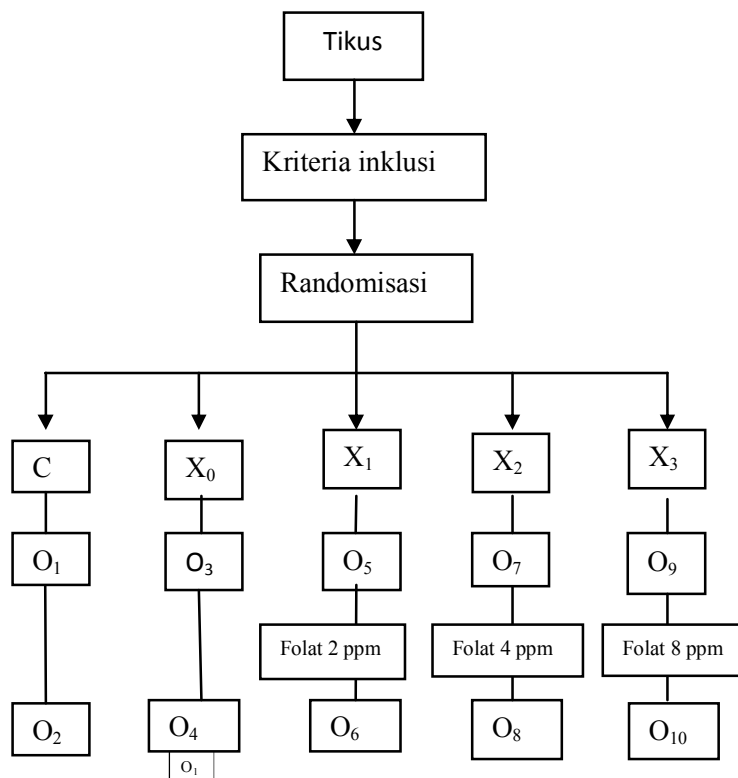


BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis dan rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan metode experimental dengan rancangan *pretest posttest randomized controlled group design*. Dua kelompok penelitian yaitu kelompok eksperimental (X1,X2,X3) dan kelompok kontrol (X0), dimana kelompok eksperimental diberikan *treatment* sedang kelompok kontrol tidak. Eksperimen yang dilakukan dengan memberikan perlakuan pada tikus SD yang di injeksi STZ 40 mg/kgbb i.p. diberi folat dengan dosis 2 ppm, 4ppm dan 8 ppm,⁵⁵ selama 30 hari dan dilakukan pemeriksaan sampel (tikus) sebelum dan sesudah perlakuan. Kelompok C di gunakan untuk kontrol rujukan laboratorium. Gambar 13. menunjukkan rancangan dan mekanisme pengukuran penelitian.



Gambar 13.
Rancangan Penelitian

Keterangan :

R = Randomisasi (5 kelompok)

C = Kelompok kontrol tikus sehat untuk hasil rujukan
laboratorium, tikus diberi pellet standart + minum *ad libitum*

X₀ = Kelompok perlakuan 1, tikus diinduksi *Streptozotocin*
(STZ) 40 mg/kgpp i.p, diberi pakan standart tikus +
minum *ad libitum*

- X₁ = Kelompok perlakuan 2, diinduksi STZ 40 mg /kgbb i.p, mendapat pakan standart tikus + minum *ad libitum* dan diberi *Folate* 2 ppm secara sonde.
- X₂ = Kelompok perlakuan 3, diinduksi STZ 40 mg/kgbb i.p, mendapat pakan standart tikus + minum *ad libitum* dan diberi *Folate* 4 ppm secara sonde.
- X₃ = Kelompok perlakuan 4, diinduksi STZ 40 mg/kgbb i.p, mendapat pakan standart tikus + minum *ad libitum* dan diberi *Folate* 8 ppm secara sonde.

Pengamatan / Observasi

- O_{1,3,5,7,9} = Pengukuran awal sampel penelitian terhadap kadar glukosa darah, Hcy plasma, trigliserid, kolesterol, LDL,HDL, kreatinin
- O_{2,4,6,8,10} = Pengukuran akhir sampel penelitian terhadap kadar glukosa darah, Hcy plasma, trigliserid, kolesterol, LDL,HDL , kreatinin.

Penelitian dilakukan pada hewan coba tikus dengan galur tikus *sprague dawley* (SD) jantan karena tikus merupakan salah satu *animal models* untuk studi perubahan fungsi, struktur dan perubahan biokimia dalam tubuh tikus. Lama penelitian 30 hari didasarkan dari perlakuan sebelumnya.⁵⁵

3.2. Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup keilmuan dalam penelitian ini adalah Ilmu Patologi Klinik, Ilmu Farmakologi dan terapi.

3.3. Tempat dan waktu penelitian

Tempat penelitian di LPPT (Lembaga pengembangan penelitian terpadu) unit IV Universitas Gajahmada. Waktu penelitian dikerjakan bulan Agustus – November 2010. Pemberian Streptozotosin untuk menjadikan tikus DM dilakukan di LPPT Unit IV. Pemeriksaan homosistein dilakukan di laboratorium GAKY FK UNDIP Semarang, pemeriksaan glukosa menggunakan alat *Accu-Chek*, dan kadar trigliserid, kolesterol, LDL, HDL diperiksa di LPPT unit I Universitas Gajahmada.

3.4. Populasi penelitian

Populasi penelitian adalah tikus *sprague dawley* yang diinduksi STZ dosis 40 mg/kgbb i.p. Tikus diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengembangan (LPPT) Bidang Layanan Penelitian pra-Klinik dan Pengembangan Hewan Percobaan UGM Yogyakarta

3.5. Sampel penelitian

Sampel penelitian adalah tikus *sprague dawley* yang diinduksi STZ dosis 40 mg/kgbb i.p dengan kriteria sebagai berikut:

3.5.1. *Kriteria inklusi :*

- a. Jenis kelamin jantan
- b. Umur 3-4 bulan
- c. Berat badan 200–250 gram
- d. Sehat (tikus yang aktif bergerak)
- e. Kadar gula darah awal <110 mg/dl
- f. Kadar glukosa darah puasa setelah diinduksi STZ adalah ≥ 200 mg/dl
- g. Kadar kreatinin normal (0,4-0,6 mg/dL).⁵⁶

3.5.2. *Besar sampel*

Perhitungan jumlah sampel berdasarkan kriteria WHO tentang penggunaan hewan coba untuk penelitian eksperimental. Besar sampel minimal adalah 5 ekor untuk setiap kelompok perlakuan.⁵⁷ Memperhitungkan faktor risiko *drop out* maka ditambah 1 ekor tikus dalam setiap kelompok perlakuan sehingga jumlah sampel pada penelitian ini adalah 30 ekor tikus terbagi dalam lima kelompok.

3.6. **Variabel penelitian**

Variabel independen : Dosis Folat (2 ppm, 4 ppm, 8 ppm)

Variabel perantara : Kadar homosistein

Variabel dependen : Kadar trigliserid, kolesterol, HDL, LDL

3.7. Definisi operasional variabel

Tabel 2. Definisi operasional variabel

No	Definisi operasional	Skala	Satuan
1	Folat adalah pemberian <i>asam folat</i> secara sonde sebanyak 1 cc/hari larutan yang mengandung 2, 4, dan 8 ppm selama 30 hari.	Rasio	ppm
2	Homosistein (Hcy) adalah kadar homosistein serum yang diukur menggunakan metode ELISA. (nilai rujukan laboratorium tidak diketahui dalam rujukan tikus jantan umur 13-22mg)	Rasio	μmol/L
3	Trigliserid adalah kadar trigliserida yang diukur secara spectrophotometer (nilai rujukan: 62-92 mg/dl)	Rasio	mg/dl
4	Kolesterol adalah kadar kolesterol yang diukur secara spectrophotometer (Nilai rujukan: 55-89 mg/dl)	Rasio	mg/dl
5	HDL adalah kadar HDL yang diukur secara spectrophotometer (nilai rujukan laboratorium tidak diketahui dalam rujukan tikus jantan umur 13-22mg)	Rasio	mg/dl
6	LDL adalah kadar LDL yang diukur secara spectrophotometer (nilai rujukan laboratorium tidak diketahui dalam rujukan tikus jantan umur 13-22mg)	Rasio	mg/dl

3.8. Bahan dan alat

3.8.1. Alat

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian meliputi:

- 1) Alat / sarana untuk perlakuan pada tikus hewan coba: kandang, tempat minum, pakan, obat ketamin untuk anestesi.
- 2) Alat untuk perlakuan pada tikus: timbangan, sonde lambung, spuit insulin, kaos tangan, sarung tangan karet.
- 3) Alat untuk preparasi sampel darah : Spuit insulin 1 cc, tabung hematokrit , tabung serologi 3 ml, pipet otomatis, *blue tip*, *mikrotube* , sentrifuse 10 – 50 μ l , label data.
- 4) Alat untuk membawa sampel: *Cool box*, *dry ice*
- 5) Seperangkat alat pengukur kadar glukosa darah : *Accu-chek*
- 6) Alat untuk memeriksa kadar *homocysteine* plasma: spektrofotometer metoda ELISA
- 7) Alat untuk memeriksa kadar trigliserid, kolesterol, LDL, HDL.
- 8) Alat untuk memeriksa kadar kreatinin serum: COBAS INTEGRA 400/700/800

3.8.2. Bahan

3.8.2.1. Bahan pakan

Pakan yang diberikan adalah pakan standart untuk tikus SD didapatkan dari LPPT IV UGM, dan *Folate* kadar 2, 4 dan 8 ppm yang pembuatannya

dilakukan di laboratorium pengujian LPPT I UGM dengan cara pemberian peroral menggunakan sonde. (Cara pengenceran folat terlampir).

3.8.2.2. *Sampel darah*

Sampel darah diambil melalui sinus orbita dengan menggunakan tabung hematokrit, darah yang keluar lewat tabung hematokrit langsung ditampung ke dalam tabung, jumlah darah yang diambil 1cc (prosedur pengambilan terlampir).

3.8.2.3. *Reagensia* (prosedur pemeriksaan terlampir)

- Streptozotocin (Sigma, USA)

STZ untuk menginduksi DM diperoleh dari LPPT 4 UGM. Pemberian streptozotocin diberikan dengan penyuntikan intraperitoneal dengan spuit insulin.

- Glukosa darah

Darah *whole blood*, Untuk pemeriksaan glukosa darah menggunakan alat *Accu-chek*.

- *Homocysteine*

Digunakan reagensia Rat Hcy Elisa kit catalog no.CSB 411336r.⁵⁸

- Lipid

Reagen Triglisericid, Kolesterol, HDL, LDL

Metode pemeriksaan : CHOD-PAP : Tes Photometrik enzimatis

- Pemeriksaan kreatinin serum: menggunakan reagen dari Cobas Integra 400/700/800 dari Roche.

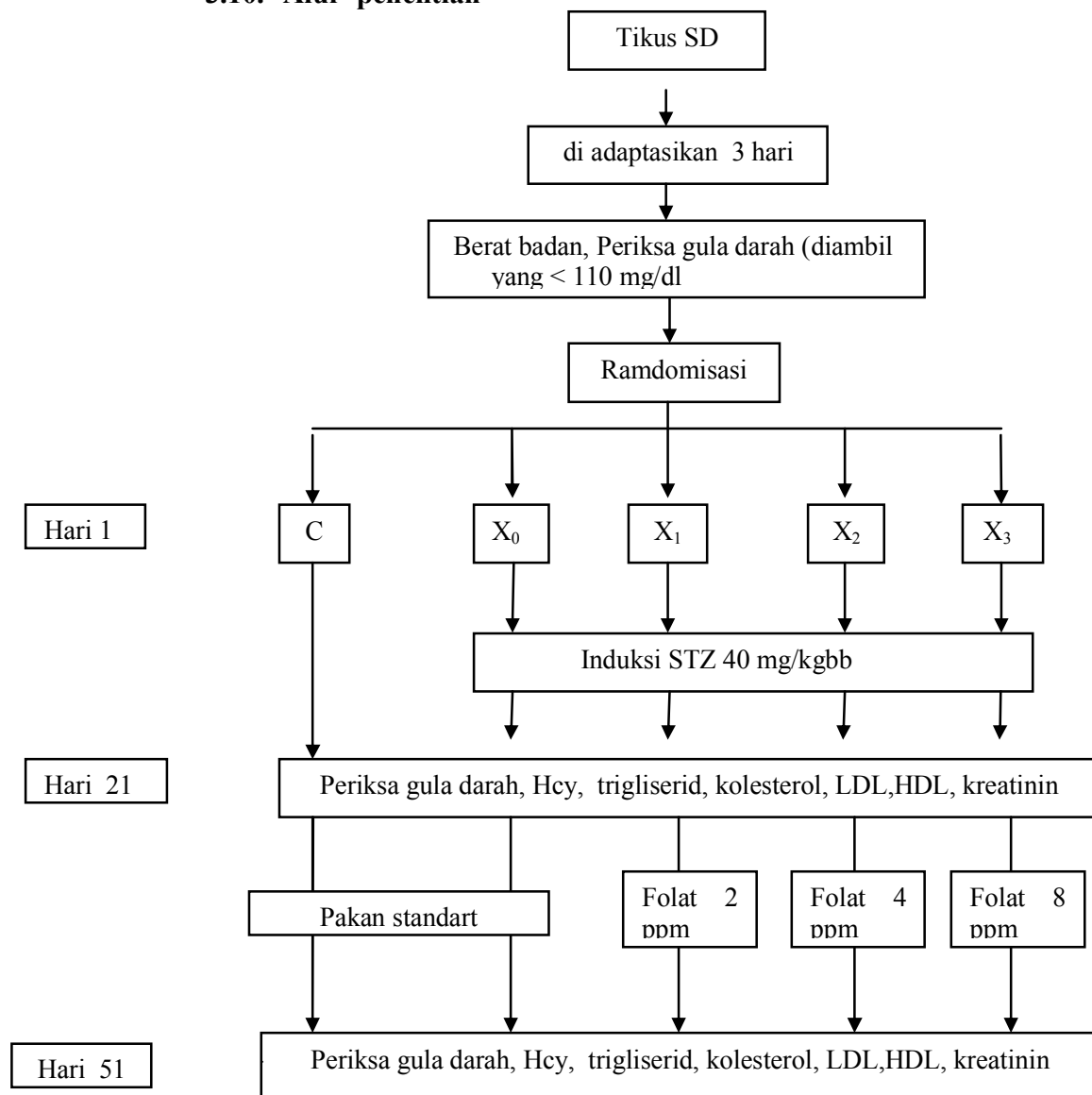
3.9. Cara mengumpulkan data

Perlakuan yang diberikan pada kelompok kontrol dan perlakuan dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Tiga puluh ekor tikus diadaptasikan dengan lingkungan baru selama 3 hari, diberi makan standar dan minum air *ad libitum*.
2. Tikus dipuasakan selama 10 jam pada hari pertama penelitian, semua diperiksa kadar glukosa darah(diambil yang < 110 mg/dl) dan di timbang berat badannya. Sebelum pengambilan darah vena lewat sinus orbital dilakukan anastesi dengan injeksi ketamin 0,2 ml secara i.m.
3. Dilakukan pengelompokan, enam sebagai tikus normal. Kelompok X_0 berjumlah 6 ekor sebagai kontrol dan kelompok tikus perlakuan (X_1, X_2, X_3) berjumlah 18 ekor, dimana kelompok X_0, X_1, X_2 , dan X_3 diinduksi dengan STZ dosis 40 mg/kgBB i.p.
4. Pada awal dan akhir perlakuan tikus dipuasakan selama 10 jam lalu dilakukan pengambilan darah lewat sinus orbital untuk pemeriksaan glukosa darah (tikus hiperglikemia dipilih yang kadar glukosa puasa > 200 mg/dl), juga diperiksa kadar *homocysteine*, kadar profil lipid (kolesterol, trigliserid, LDL dan HDL) , dan kreatinin .
5. Kelompok X_{1-3} yang diinduksi dengan STZ 40 mg/kgbb secara i.p diberi pakan standar dan folat secara sonde sesuai dengan dosis yang telah ditetapkan selama 30 hari.
6. Setelah 30 hari perlakuan, semua tikus dipuasakan selama 10 jam. diambil sampel darahnya untuk penentuan kadar glukosa, homosistein,

profil lipid (kolesterol, trigliserid, LDL dan HDL) ,kreatinin (prosedur pemeriksaan di lampiran).

3.10. Alur penelitian



Gambar 14:
Alur penelitian.

3.11. Analisis data statistik

Data yang sudah terkumpul dilakukan *editing*, *coding*, dan *entry* memakai dalam file computer. Setelah dilakukan *clearing*, data dianalisis secara statistik dengan bantuan program SPSS versi 15. Data yang sudah terolah kemudian dianalisis secara diskriptif menampilkan nilai rerata dan simpangan baku⁵⁹ dari glukosa darah, kreatinin, homosistein dan profil lipid. Hasil dibuat dalam bentuk tabel kemudian dibuat grafik *box-plot* menurut kelompok perlakuan. Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Pengujian hipotesis pengaruh pemberian folat terhadap kadar Hcy, trigliserid sebelum dan sesudah penelitian menggunakan wilcoxon (normalitas data sebagian tidak normal) sedangkan pengujian hipotesis pengaruh pemberian folat terhadap kadar kolesterol, LDL, HDL sebelum dan sesudah penelitian menggunakan *t* tes berpasangan (normalitas data normal).⁶⁰ Nilai signifikansi penelitian $p < 0,05$.

3.12. Etika penelitian

Etika penelitian dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang dengan No.49/EC/FK/RSDK/2010.